

Fusarium mikotoxinok összehasonlító citotoxicitási vizsgálata primer ideg- és asztroglia sejt tenyészeteken

TDK dolgozat
biológia – kémia osztatlan tanárszak

készítette:
SZENTGYÖRGYI VIKTÓRIA

témavezető:
DR. TÁRNOK KRISZTIÁN
adjunktus
Élettani és Neurobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2017.

Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| 1. Összefoglaló | 2 |
| 2. Bevezető | 3 |
| 2.1. Fumonizinek..... | 6 |
| 2.2. A trichotecének és a deoxinivalenol | 7 |
| 2.3. A zearalenon | 8 |
| 3. Célkitűzések..... | 9 |
| 4. Anyagok és módszerek | 10 |
| 4.1. Laboratóriumi állatok tartása | 10 |
| 4.2. Sejtkultúrák | 10 |
| 4.2.1. <i>Kevert tenyészetek</i> | 10 |
| 4.2.2. <i>Neuron tenyészetek</i> | 11 |
| 4.2.3. <i>Kevert glia tenyészetek</i> | 11 |
| 4.3. Toxinok és kezelések | 12 |
| 4.4. A sejtek életképességének vizsgálata MTT-módszerrel | 12 |
| 4.5. Statisztikai analízis..... | 13 |
| 5. Eredmények..... | 14 |
| 5.1. Mikotoxinok hatása kevert tenyészet életképességére | 14 |
| 5.2. Mikotoxinok hatása tiszta neuron tenyészet életképességére..... | 16 |
| 5.3. Mikotoxinok hatása kevert glia tenyészet életképességére | 18 |
| 5.4. Az eredmények összefoglalása | 21 |
| 6. Diskusszió..... | 22 |
| 6.1 A fumonizin B ₁ mikotoxin a kortikális eredetű sejtkultúrák életképességét jelentősen nem befolyásolja | 22 |
| 6.2 A deoxinivalenol a kortikális sejtkultúrák életképességét csökkenti | 24 |
| 6.3 A zearalenon az idegi sejtkultúrák életképességét nem proliferatív úton, jelentősen növeli | 25 |
| 7. Szerzői hozzájárulás | 27 |
| 8. Köszönetnyilvánítás | 28 |
| 9. Irodalom és ábrajegyzék | 29 |
| 10. Mellékletek | 33 |

1. Összefoglaló

A szántóföldi növényeket fertőző penészgombák a növénytermesztés kezdete óta problémát jelentenek az ember számára. Anyagcseréjük során olyan másodlagos metabolitokat termelnek, melyek toxikusak lehetnek emberre, állatra egyaránt. A termelt toxinok a gomba elpusztulása után is jelen lehetnek a fertőzött növényekben, és nagy hőstabilitásuk miatt a feldolgozás, hőkezelés sem képes eliminálni őket. A *Fusarium* gombafajok által termelt toxikológiai szempontból fontos vegyületek a fumonizinek, a trichotecének (mint a deoxonivalenol) és a zearalenon. Bár e vegyületek élettani hatásairól számos közlemény született, az idegszövet sejtjeire kifejtett közvetlen sejtszintű hatásaikról keveset tudunk.

Munkám során három *Fusarium* mikotoxin, a fumonizin B₁, a deoxinivalenol és a zearalenon rövid távú, közvetlen, idegszöveti sejtekre kifejtett citotoxikus hatását egerekből nyert primer idegi sejtenyészetek felhasználásával, *in vitro* körülmények között vizsgáltam. A toxinok hatását 1nM-50μM alkalmazott koncentráció tartományban, 24 és 48 órás kezelést követően MTT módszerrel elemeztem. Annak vizsgálatára, hogy a toxinok a központi idegrendszer főbb sejttypusainak túlélésére nézve rendelkeznek-e szelektív hatással, méréseimet csak asztroglia sejteket tartalmazó tenyészeteken, tiszta agykérgi idegsejt tenyészeteken és e sejtek mindegyikét tartalmazó, ún. kevert tenyészeteken is elvégeztem.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a deoxinivalenol koncentrációfüggő életképesség csökkenést eredményezett mindhárom típusú tenyészetben. A fumonizin B₁ glia és kevert sejt kultúrákon szignifikáns életképesség növekedést, tiszta idegsejt tenyészeteken azonban magasabb koncentrációban (50 μM) jelentős életképesség csökkenést okozott, a kontroll értékekhez viszonyítva. A zearalenon a teljes vizsgált koncentrációtartományban, a sejtek proliferációs aktivitásától függetlenül szignifikánsan növelte mindhárom típusú sejt kultúra viabilitását.

Eredményeim hozzájárulhatnak a *Fusarium* toxinok idegrendszeri hatásainak felderítését és a tolerálható humán- és állategészségügyi értékek pontosabb meghatározását célzó törekvésekhez.

2. Bevezető

A mezőgazdaságban régóta ismert probléma a gabonanövények fonalas gombák általi fertőződése. Bizonyos körülmények között ezek az organizmusok ún. mikotoxinokat termelnek, melyek komoly veszélyt jelentenek mind állat-, mind humánegészségügyi szempontból.

A fonalas gombák obligát aerob, heterotróf, talajlakó élőlények. A működésük során kiválasztott másodlagos anyagcsere termékeknek, a mikotoxinoknak látszólag



1. ábra Talajból izolált *Fusarium culmorum* laktofuszinban festett konídiumai [1]

nincs funkciója a gombák normál metabolismusában (da Rocha és mtsai., 2012). Nemcsak a gomba micéliumában lehetnek jelen endotoxinként, hanem kiválasztódhatnak a környezetbe is (exotoxin). Így a gomba jelenlétének hiánya még nem garantálja a toxinmentességet. A gombafertőzés kiemelkedő veszteséget okozhat a növénytermesztésben, csökkenti a terméshozamot, a vetőmag minősége romlik, illetve a takarmány fertőződésével

az állattenyésztésben is problémát jelent. Állatoknál súlyos megbetegedéseket, elhullást, a táplálékfelvétel csökkenését, az immunrendszer gyengülését, szaporodásbeli problémákat okozhat (Jávor és Szigeti, 2011). Az okozott tünetegyütteseket összefoglalóan mikotoxikózisnak nevezzük. Ezen betegségek nem fertőzőek, nincs ellenük védőoltás vagy antibiotikum, hiszen a felelős vegyületek kis molekulatömegű abiotikus anyagok (Marin és mtsai., 2013). A toxinok kimutatása nehéz, mivel nem állnak rendelkezésre a megfelelő analitikai módszerek, valamint általában csak kis koncentrációban, viszont sokszor együtt fordulnak elő az adott gabonában. Így a hatásukra megjelenő tünetek sem specifikusak. Kölcsönhatásaik által kialakuló egészségkárosodások felderítéséhez pedig sokszor további kutatások szükségesek.

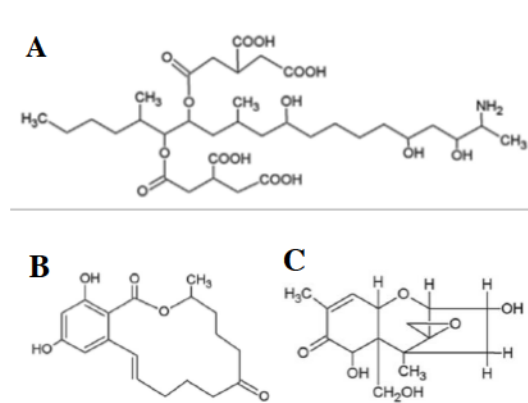
A mikotoxinok rendkívül hőstabilak, így metabolitjaikkal együtt a táplálékláncba bekerülve jelentős gondokat okozhatnak (Jávor és Szigeti, 2011). Az élelmiszerekbe direkt vagy indirekt úton kerülhetnek. Előbbiről akkor beszélünk, mikor maga a kész élelmiszer tartalmaz toxintermelő gombát. Utóbbi esetén az adott élelmiszer összetevői szennyezettek mikotoxinokkal azután, hogy a gomba maga már rég nincs jelen (da Rocha és mtsai., 2014). Ezért a legjobb védekezés, ha megakadályozzuk a gabonák fertőződését, ami jelentős odafigyelést igényel a termesztés, aratás, tárolás, feldolgozás, szállítás során is (Jávor és Szigeti, 2011). Emberbe részben növényi termékekkel (kenyerek, tésztafélék, müzlik, gabonapelyhek, sör) részben tej, sajt, hús és más állati termékek fogyasztásával juthatnak (da Rocha és mtsai., 2014).



2. ábra A kalászfuzáriózis jellegzetes tünete. A kaláson kifehéredett, terméketlen kalászszemek (nyíl) jelennek meg. [2]

A toxinokat termelő gombák között megkülönböztetünk szántóföldi penészgombákat, melyek elszaporodásához hozzájárul a nagy nedvességtartalom, valamint raktári penészeket, melyek kisebb víztartalom mellett is életképesek (Jávor és Szigeti, 2011). A szántóföldi penészekhez tartoznak a *Fusarium* gombafajok,

fertőzésüket **fuzáriózisnak** nevezzük. Magyarországon fontos fuzáriózist okozó penészgombafajok a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium culmorum* (1. ábra). Az általuk okozott kalászfuzáriózisra a kifehéredett, terméketlen kalászból lehet következtetni (2. ábra). Erős esőzés és a gabona megdőlése kedvez a fertőzés kialakulásának¹, mivel ilyenkor



3. ábra (A) a fumonizin B₁, (B) a zearalenon és (C) a deoxinivalenol általános szerkezete [3]

¹ Fertőzés szempontjából a gabonák virágzási periódusa a legkritikusabb.

könnyebben felverődnek a gombaspórák a talajról, elhalt növényi részekről. A meleg, nedves idő tovább segíti a gombaspórák kihajtását. A fuzáriumtoxinok közül a legnagyobb veszélyt a trichotecének, fumonizinek és a zearalenon (3. ábra) hordozzák (Fuzárium NÉBIH tájékoztató).

A fuzárium toxinok leginkább búzával és kukoricával jutnak az élelmiszerláncba, és sajnos nagyon gyakoriak. Az eltűrhető napi bevitel értékük megállapítása (TDI, Tolerable Daily Intake), melyet akár rendszeresen fogyasztva sem lép fel egészségkárosodás, állatkísérletek segítségével történik (Fuzárium NÉBIH tájékoztató). Azt a toxinmennyiséget, amely mellett még nem alakul ki sem morfológiai, sem funkcionális elváltozás NOAEL értéknek hívjuk (No Observed Adverse Effect Level; Kovács és mtsai., 2016). Mivel az egyes fajok és egyedek érzékenységekben eltérések mutatkoznak, ezt számot még biztonsági faktorról (általában százszal) osztják, és testsúlykilogrammmra vonatkoztatva adják meg (TDI = NOAEL/biztonsági faktor/testtömeg). Amennyiben a tényleges napi bevitel huzamosabb ideig meghaladja ezt az értéket, egészségromlás veszélye merülhet fel (Fuzárium NÉBIH tájékoztató).

| Mikotoxinok | TDI µg/ttkg/nap |
|--|---|
| DON | 1 (SCF, 2002.) 1 (PMTDI, JECFA, 2011.) |
| zearalenon | 0,25 (EFSA, 2013) 0,5 (PMTDI, JECFA, 2002) |
| fumonizin B₁, B₂, B₃ | 2 (SCF, 2003) 2(JECFA, 2011)** |

1. táblázat Fuzáriumtoxinok nemzetközi értékelő testületek által megállapított eltűrhető napi beviteli értékei (**): A TDI-t a fumonizin B₁, B₂ és B₃ együttesen határozza meg, együttes jelenlétük esetén is 2 µg/ttkg/nap. PMTDI: ideiglenes tolerálható napi bevitel (provisional maximum tolerable daily intake), DON esetén DON-ra és acetilált származékaira (3- és 15 acetil-DON) együtt.
SCF (Scientific Committee on Food): Európai Bizottság, Élelmiszerek Tudományos Bizottsága
EFSA (European Food Safety Authority): Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): a FAO/WHO élelmiszer szennyezőanyagok és adalékanyagok értékelésével foglalkozó tudományos testülete (Fuzárium NÉBIH tájékoztató)

Az Európai Unió tagországaiban egy 2003-ban végzett SCOOP felmérés² vizsgálta a Fusarium toxinok előfordulását az élelmiszerekben. Az eredmények alapján

² Scoop felmérés: az Európai Unió tagállamaiban indított tudományos kooperációs (scientific cooperation) feladat

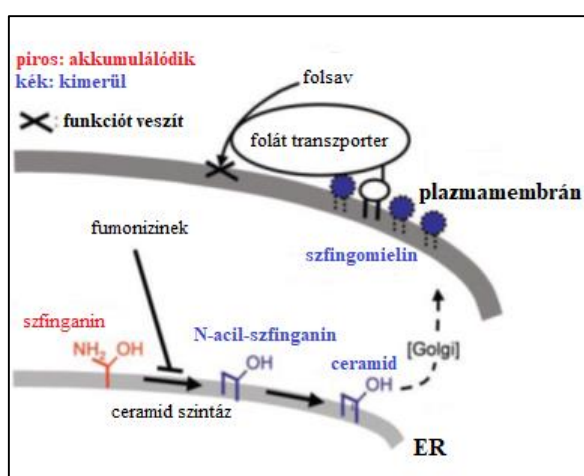
a felnőttek esetében a napi bevitel a TDI értéknél kisebbnek adódott, a csecsemők és a kisgyermekek esetén pedig – különösen a deoxinivalenolnál (DON) - megközelítette azt³. Bár az élelmezési célra szánt gabonák maximális toxintartalma szabályozott, pl. deoxinivalenol esetén az európai uniós határérték kenyérben 500 µg/kg. Ha éppen a határértéknek felel csak meg a fogyasztott kenyér, és belőle 20 dkg-ot, vagyis két nagy szeletet elfogyasztunk, akkor szervezetünkbe 100 µg toxin kerül. Ez egy 60 kg-os embernél 1,67 µg/ttkg-t jelent, ami meghaladja az eltűrhető napi beviteli értéket. (Fuzárium NÉBIH tájékoztató, 1. táblázat)

2.1. Fumonizinek

Az egyik *Fusarium* toxin csoport, a fumonizinek izolálására és kémiai szerkezetük meghatározására 1988-ban került sor (Gelderblom és mtsai., 1988). Ezen vegyületeket a *Fusarium* gombák sok faja termeli, főként a *Fusarium verticillioides*, a *F. proliferatum* és a *F. nygamai* fajok, melyek világszerte előfordulnak a gabonákon, elsősorban a kukoricán (da Rocha és mtsai., 2014). A többi, szerves oldószerben oldható mikotoxinnal ellentétben a fumonizinek vízzoldhatók (da Rocha és mtsai., 2014). Meglehetősen hőstabilak, csak 150 °C feletti hőkezelés csökkenti szignifikánsan a toxintartalmat (Marin és mtsai., 2013). Jelenleg legkevesebb 15 fumonizin analóg ismert, közülük toxikológiai szempontból a legfontosabb a fumonizin B₁ (FB₁) (Domijan, 2012). Az élő szervezetekre kifejtett hatása fajoként és nemeként is eltér. A legérzékenyebbek rá a lovak és a sertések. Lovakban agylágyulást (leukoencephalomalacia – ELEM), az agy fehérállományában nektrotikus léziók megjelenését idézi elő, melynek tünetei a letargia, a vakság, az étvágytalanság, görcsök kialakulása, részleges bénulás és akár pár órán belül bekövetkező halál (Marin és mtsai., 2013). Sertésekben hatásukra tüdőödéma lép fel, míg rágcsálókban máj és vesekárosítónak bizonyult. Az FB₁-t emberi megbetegedéseket is okozhat. Dél-Afrikában Transkei tartományban, ahol a kukorica az egyik legfontosabb élelmiszer, szoros összefüggésbe hozták a nyelőcsőrák kialakulásával. Közép-Amerikában, Kínában, Dél-Afrikában velőcső károsodási eseteket kötöttek FB₁ tartalmú ételek fogyasztásához (Marasas és mtsai., 2004).

³ A zearalenon és a fumonizinek esetében a napi átlagos bevitelt jelentősen TDI alattinak találták.

Az FB₁ csak kis mértékben szívódik fel a bélcsatornán keresztül, gyorsan eliminálódik a vérplazmából, így a szövetekben kevéssé akumulálódik, bár kis mennyiségek a májban és a vesében kimutathatók (Domijan, 2012). Szerkezete erősen hasonlít a sejtmembránok bioszintézisében szerepet játszó szfinganinhoz és a szfingozinhez, melyek a szfingolipidek alapvázát adják. Emiatt a hasonlóság miatt a fumonizin B₁ erősen gátolja a ceramid szintáz enzimet, mely a szingolipid-szintézis kulcsenzime (4. ábra). A ceramid szintáz katalizálja a szfinganin acilációját, gátlásával tehát csökken a ceramid és a komplex szfingolipidek *de novo* bioszintézise. Mivel szfingolipidek a sejtmembránok fontos összetevői, az FB₁ így befolyásolja a



4. ábra A fumonizinek hatása a membránalkotó szfingolipidek bioszintézisére. Kompetitíven gátolják a ceramid szintáz szfinganin acilező aktivitását, mely fontos lépése a membránalkotó szfingolipidek bioszintézisének. [4]

membránfunkciókat (Domijan, 2012).

Az FB₁ másik célpontja a mitokondrium, ahol a mitokondriális elektrontranszportlánc I. komplexét gátolva, csökkenti a sejtlégzést és a mitokondriális membránpotenciált, mely végül az oxidatív szabadgyökök túltermelését eredményezi. Hatásának eredményeként a mitokondriális Ca²⁺ felvétel csökken, a citoplazma Ca²⁺ szintje nő, ami végsősoron a sejt halálához vezethet (Domijan, 2012).

2.2. A trichotecének és a deoxinivalenol

Másik fontos csoportja a fuzáriumtoxinoknak a szeszkviterpenoid vegyületcsaládba tartozó trichotecének, melyek nem illékony, alacsony molekulatömegű, ciklohexén alapgyűrűvel rendelkező, funkciós csoportjaik alapján A, B, C és D típusba sorolható molekulák. Toxikológiai szempontból a vomitotoxinként is ismert, B típusú trichotecének közé tartozó deoxinivalenol (DON) kiemelt jelentőségű. Fő termelői a *Fusarium graminearum*, a *F. culmorum* és a *F. cerealis* penészfajok, melyek legnagyobb gyakorisággal kukoricán és búzán fordulnak elő, de rizs, zab, árpa, rozs növényeken is élhetnek. Rendkívül stabil vegyületek, az őrlés, tárolás, szállítás és az ételek főzése során sem degradálódnak. Akut hatásai emberben a mellkasi fájdalom,

szédülés, fejfájás, torokirritáció, hányinger, hányás és hasmenés. Krónikus DON kitettség állatokban súlyvesztést, anorexiát, májnagyobbodást, valamint a szérumfehérjék és albuminok, a hematokrit érték, a szérum kalcium és foszfor tartalmának és a pajzsmirigy méretének csökkenését okozza. Növeli a hajlamot a fakultatív patogénekkal való megfertőződésre. Sertésekben neurotoxikus hatással is bír (Marine és mtsai., 2013).

A DON sejtszintű hatásai viszonylag ismertek. Kötődik a riboszómák 60S alegységéhez, így gátolja a fehérjeszintézist. Hatással van a sejt és sejtorganellumok membránjára, beleértve a mitokondriális membránt. Humán sejtvonalakban oxidatív stressz mediálta DNS károsodást okoz (Arunachalam és Doohan, 2012). Sertés és humán sejtvonalatokat 50 μ M koncentrációban kezelve csökkenti a transzepiteliális elektromos rezisztenciát (TEER) és a patogének számára növeli a membrán átjárhatóságát⁴ (Pinton és mtsai., 2009). Számos *in vivo* és *in vitro* tanulmány született a DON immunstimuláns és immunszuppresszív hatásáról, mely a dózistól, szövet és sejttípustól, expozíció gyakoriságától is függött. Kis dózisban növeli számos gyulladásos citokin szintjét, emeli a szérum IgA szintjét. Magas koncentrációban azonban immunszuppressziót okozott, csökkent IgM és IgG szintet, leukocita számot mértek. Rágcsáló makrofágokban pedig apoptózist indukált (Arunachalam és Doohan, 2012).

2.3. A zearalenon

Zearalenont (ZEA) főként a *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, és *F. verticillioides* fajok termelnek. Legfontosabb származékai az α -zearalenol és β -zearalenol. Az ösztrogén receptorokhoz való nagy kötőaffinitása miatt a mikoösztrogénekhez sorolják. 150°C-ig hőstabil, csak magas hőmérsékleten és nyomáson, lúgos körülmények között degradálható. Ösztrogénszerű hatása miatt első sorban reprodukív problémákkal hozzák kapcsolatba, így adenocarcinomában szenvedő nők méhnyálkahártyájának szövetében, valamint *endometrium hyperplasia* esetekben is kimutatták. Feltételezik, hogy Puerto Ricóban tapasztalt tömeges korai nemi érés okozója volt (Marine és mtsai., 2013). Növeli a kockázatát az emlő- és méhnyakráknak is (Dong és mtsai., 2007). Állatokban hosszan tartó, étrend-szerű fogyasztása karcinogén, genotoxikus, reprodukív és immuntoxicitási kórlépeket okoz. Vemhesség alatt csökkenti az embriók túlélését és súlyát. Vulváris dilatációt, vulvovaginitist,

⁴ A membrán barrier deficitje a claudin-4 *tight junction* fehérjék csökkent expressziója miatt alakult ki.

tejhiányt, rektális prolapszust eredményez. Hímekben csökkenti a tesztoszteron szintet, herék súlyát, a spermatogenezist, emellett feminizációt okoz és csökkenti a libidót (Marine és mtsai., 2013).

3. Célkitűzések

A *Fusarium* mikotoxinok szisztémás hatásairól egyre többet tudunk, célzottan az idegrendszerre gyakorolt hatásaikról azonban viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk, különösen kevés adat áll rendelkezésre sejtszintű hatásaikról. Az általuk okozott szisztémás változások, és a belőlük kialakuló különböző metabolitok miatt idegrendszeri hatásmechanizmusukat *in vivo* körülmények között igen bonyolult vizsgálni. Munkánk során *in vitro* körülmények között annak felderítésére törekszünk, hogy a zearalenon, a fumonizin B₁ és a deoxinivalenol mikotoxinok jelenléte hogyan befolyásolja idegszöveti sejtek túlélését.

TDK munkám során célul tűztem ki:

- a három mikotoxin koncentráció függő hatásának életképességi teszttel történő vizsgálatát primer agykérgi tenyészeteken *in vitro*. Ezek a tenyészetek modellezik az idegszövetre gyakorolt hatást, mivel az idegrendszer főbb sejttypusait, az ideg- és az asztroglia sejteket is tartalmazzák.
- hogy létrehozzak tiszta, csak ideg-, illetve csak asztroglia sejteket tartalmazó tenyészeteket annak vizsgálatára, hogy mely sejttypus a fő célpontja ezen toxinoknak. Arra is kerestem a választ, hogy vajon az idegsejtek vagy a glia sejtek érzékenyebbek-e az adott vegyületre.
- a mikotoxin expozíciós időtartam (24 vs. 48 óra) hatásának vizsgálatát is.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Laboratóriumi állatok tartása

A vizsgálatainkhoz használt CD1 vad típusú egereket állatházunkban 22 ± 1 °C-on, 12 órás világos/ sötét megvilágítási periódusok mellett tartottuk. Vízet és táplálékot *ad libitum* biztosítottunk számukra. Minden elvégzett állatkísérlet megfelelt a kísérleti állatok használatára vonatkozó helyi és EU-s jogszabályoknak, irányelveknek és előírásoknak (állatkísérletes engedélyszám: PEI/001/1108-4/2013 és PEI/001/1109-4/2013).

4.2. Sejtkultúrák

Vizsgálataimat *i*) csak idegsejteket (tisztá neuron tenyészet), *ii*) asztroglia és mikroglia sejteket (kevert glia tenyészet), illetve *iii*) gliasejteket és neuronokat egyaránt tartalmazó (kevert tenyészet) primer sejtenyészeteken, *in vitro* végeztem.

4.2.1. Kevert tenyészetek

A primer kortikális sejtenyészeteket 14-16 napos CD1 egérembriók kortexéből készítettem, a laboratóriumunkban használt protokoll szerint (Tárnok és mtsai., 2008). Az agyhártyák eltávolítása után az előagyból kicsippentettem a gangliondombot, majd az agykérget feldaraboltam. A kéregdarabokat 0,5 mg/ml koncentrációjú tripszin-EDTA (Thermo Scientific) oldatban 37 °C-on, 15 percig emésztettem. Az emésztést főtális borjú szérummal (FCS, PAN-BioThech) állítottam le. A szövetből a sejteket rövid idejű mechanikai triturálással szabadítottam ki, melyet 5% FCS tartalmú Neurobasal tápfolyadékban (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 5% FCS, 40 ug/ml gentamycin, 2,5 ug/ml amphotericinB, Thermo Scientific), a homogén sejtszuszpenzió eléréséig végeztem. A sejteket poli-L-lizinnel (Sigma) bevont 96-lyukú tenyésztő lemezekre (Greiner), 8×10^4 db sejt/lyuk sejtsűrűségben ültettem ki. A tenyészeteket 5% FCS tartalmú Neurobasal tápfolyadékban (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 5% FCS, 40 ug/ml gentamycin, 2,5 ug/ml amphotericinB, Thermo) 37 °C-on, 5% CO₂ koncentrációjú atmoszférában tartottam, majd a kiültetés utáni első napon (DIV1)⁵ a tenyészetek tápfolyadékát FCS mentes Neurobasal tápfolyadékra (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 40 ug/ml gentamycin, 2,5 ug/ml amphotericinB) cseréltem. A negyedik napon (DIV4) a tápfolyadék felét friss, FCS mentes Neurobasal tápfolyadékra

⁵ A *days in vitro* (DIV) jelölés a kiültetést követő, tenyészetben eltöltött időt jelenti.

cseréltem. A glia sejtek további sejtosztódását - miután a kiültetést követő 4-6. napra (DIV4 – DIV6) összefüggő gliaszőnyeget hoztak létre a neuronok alatt - 10 μ M végkoncentrációjú citozin-arabino-furanozid kezeléssel (CAR, Sigma) meggátoltam. A tenyészeteket a kiültetés utáni kilencedik napig tartottam fent (DIV9). A sejteket a kiültetés utáni hetedik, nyolcadik napon (DIV7-DIV8) a vizsgált mikotoxinokkal különböző koncentrációban és ideig kezeltem (részleteket lásd a szövegben).

4.2.2. Neuron tenyészetek

Tiszta, csak kortikális neuronokat tartalmazó primer tenyészetek kiültetését a kevert tenyészetekkel azonos módon végeztem (Liliom és mtsai., 2017). Az idegsejtek megfelelő fejlődéséhez szükségesek olyan faktorok is, melyeket az asztroglia sejtek állítanak elő. Mivel a tiszta neuron tenyészetek alapvetően gliasejt mentesek, ezért 48 óráig FCS mentes Neurobasal tápoldatban tartott asztroglia tenyészetek tápfolyadékát 1:1 arányban friss, FCS mentes Neurobasal tápoldattal kevertem, és az így kapott ún. kondicionált médiumot használtam a további tápcseréknél. A kiültetés utáni első napon (DIV1) teljes, a negyedik napon (DIV4) felező tápcserét végeztem. Az alacsony glia tartalom elérése érdekében a glia sejtek osztódást már DIV1 időpontban 10 μ M végkoncentrációjú CAR-kezeléssel leállítottam. Az ilyen tenyészetekben az asztroglia sejtek aránya 5% alatti. A sejteket a kiültetés utáni hetedik, nyolcadik napon (DIV7-DIV8) használtam fel a vizsgálataimhoz.

4.2.3. Kevert glia tenyészetek

A primer glia sejttenyészeteket 2-4 napos újszülött CD1 egerekből a laboratóriumunkban alkalmazott protokoll szerint készítettem (Tárnok és mtsai., 2010). Az agyhártyák eltávolítása után a féltekéket feldaraboltam, 0,05% DNáz (Sigma) tartalmú és 0,5 mg/ml koncentrációjú tripszin-EDTA oldatban (Thermo Scientific) 15 percig 37°C hőmérsékleten inkubáltam, majd az emésztést FCS-sel állítottam le. 10% FCS tartalmú HDMEM (high glucose DMEM, Sigma) tápoldatban végzett mechanikai disszociálattal egysejt szuszpenziót készítettem, majd a sejteket 10 cm átmérőjű poli-L-lizinnel (Sigma) bevont Petri-csészékre (Greiner) ültettem ki. A tenyészeteket 10% FCS tartalmú HDMEM tápoldatban (high glucose DMEM, 10% FCS, 40 μ g/ml gentamycin, 2,5 μ g/ml amphotericinB, Sigma) 37 °C-on, 5% CO₂ koncentrációjú atmoszférát biztosító inkubátorban tartottam. A primer tenyészeteken 4 naponta 10% FCS-HDMEM tápoldattal teljes tápcserét végeztem. A gliális tenyészetekben az asztroglia sejtek egy adott sejtsűrűség eléréséig folyamatosan osztódnak. Így

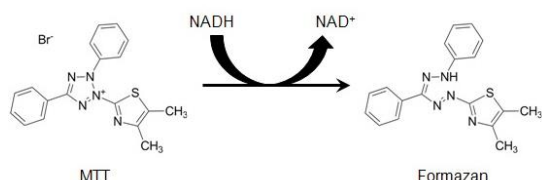
kezeléseimet mindig a sejtek poli-L-lizinnel bevont 96 lyukú szövettenyésztő tálcába ültetését követő első napon végeztem.

4.3. Toxinok és kezelések

A mikotoxinok idegszöveti sejtekre kifejtett *in vitro* hatásának vizsgálatára a 96-lyukú szövettenyésztő tálcákba kiültetett sejteket deoxinivalenol (Tocris), zearalenon (Tocris) és fumonizin B₁ (Tocris) toxinokkal kezeltem. A deoxinivalenolt 10%-os etil-alkoholban, a zearalenont 10% etil-alkohol és 50% DMSO elegyében, a fumonizin B₁-et 10%-os DMSO-oldatban oldottam be. Az 1 mM-os koncentrációjú törzsoldatokból a tenyészetek saját tápoldatának segítségével hígítási sorozatot készítettem (1 nM - 50 µM). A mikotoxin kezelést az idegsejteket tartalmazó tenyészeteken DIV7/DIV8 időpontban, a glia tenyészeteken az átültetést követő első napon 24, illetve 48 óráig végeztem. Kontrollként a mikotoxinok beoldásához használt, fent leírt összetételű oldószerekkel kezeltem a sejteket.

4.4. A sejtek életképességének vizsgálata MTT-módszerrel

A mikotoxinok citotoxicitásának vizsgálatára 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) (Sigma) alapú életképesség tesztet alkalmaztam. Az



5. ábra Az MTT formazán átalakulás. Az életképesség mérés ezen a reakción alapszik, a NAD(P)H dehidrogenáz aktivitást méri. [5]

életképes, aktív metabolizmusú sejtekben a NAD(P)H dehidrogenáz az MTT vegyületet kék színű formazánná redukálja (5. ábra), melynek mennyisége spektrofotometriával meghatározható. A keletkezett formazán mennyisége arányos az életképes sejtek

számával. A vizsgálatot 96-lyukú tálcákon fenntartott tenyészeteken, a toxinkezelést követően 24, illetve 48 órával végeztem. Az egyes lyukakhoz 200 µg/ml végkoncentrációban MTT-t adtam, majd a lemezeket 35-40 percig 37°C hőmérsékleten inkubáltam. A formazán kristályok megjelenését mikroszkópban ellenőriztem, majd a kristályokat savas izopropil-alkohollal feloldottam. Az oldatok optikai denzitását Multiscan EX spektrofotométerrel (Thermo) 570 nm-es hullámhosszon, 620 nm-es referencia hullámhossz mellett detektáltam. A kapott adatokat a kontroll, oldószerkezelt lyukak adatainak százalékában adtam meg (életképesség %).

4.5. Statisztikai analízis

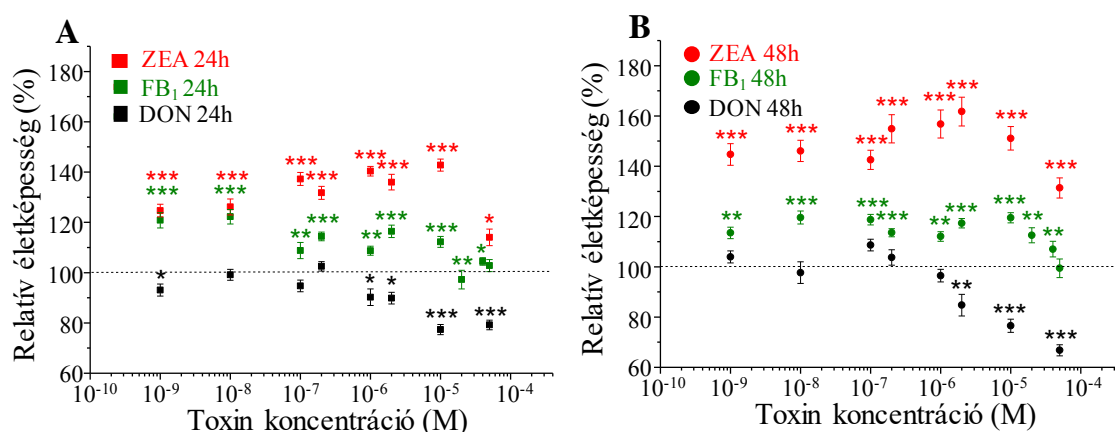
Tenyészettípusonként és kezelési csoportonként az egyes mikotoxinok hatását vizsgáló életképességi tesztek eredményei legalább 3 független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származnak. Az adatok statisztikai elemzését SPSS programmal (IBM) végeztem. Az adatok normál eloszlásának vizsgálata Kolmogorov-Szmirnov-próbával, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett történt. Normáleloszlás esetén a szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztam meg. *Post hoc* tesztként Tukey-próbát alkalmaztam. Ha sérült a normáleloszlás, nem-paraméteres Kruskal–Wallis-próbát használtam. Az eredmények bemutatásánál „*” jelölést a kontrollhoz képest számított szignifikancia (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$) esetén alkalmaztam. Adataimat átlag \pm SEM (standard error of mean) formában adtam meg. „\$” jelölést a 24 és 48 órás adatok közötti szignifikancia bemutatásánál használtam (\$: $p < 0,05$), melynek megállapítása Kolmogorov-Szmirnov-próbával történt.

5. Eredmények

5.1. Mikotoxinok hatása kevert tenyészet életképességére

A mikotoxinok idegszöveti sejtekre kifejtett hatásának *in vitro* tanulmányozásához elsőként 14-15 napos egérembriók agykérgéből ún. kevert primer sejtenyészeteket állítottam elő. Ezekben a tenyészetekben mind ideg- mind asztroglia sejtek megtalálhatóak. A sejtenyésztés első hetének végére a tenyészetekben egybefüggő glia sejtréteg alakul ki, melynek felszínén sűrű, érett neuronokat tartalmazó idegsejthálózat fejlődik (Lesuisse és Martin, 2001).

A 96 lyukú szövettenyésztő tálcában fenntartott sejteket a kiültetést követő 7. vagy 8. napon (DIV7-8) a zearalenon (ZEA), a deoxinivalenol (DON), valamint a fumonizin B₁ (FB₁) toxinok egyikével, 1 nM-50 µM koncentrációban kezeltem. A tenyészetek életképességét 24, illetve 48 órás folyamatos kezelést követően MTT módszerrel határoztam meg (Mosmann és mtsai.,1983).

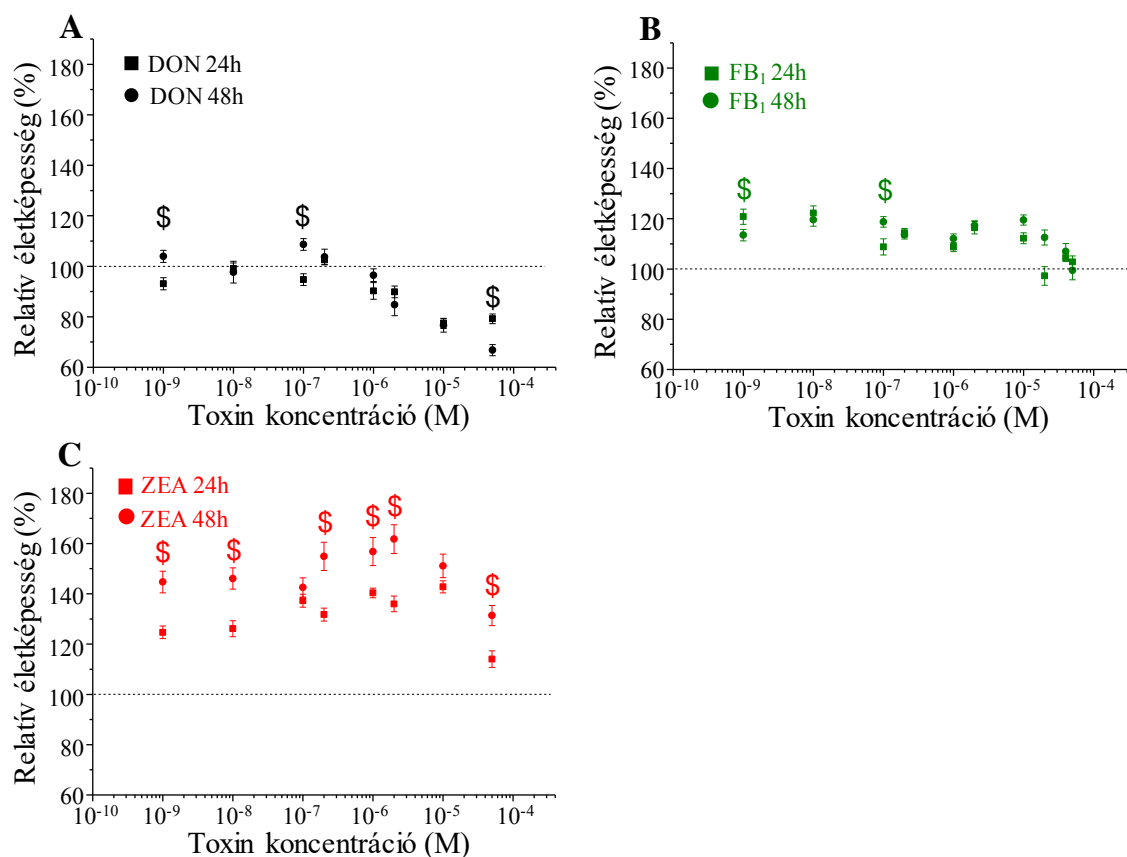


6. ábra. Zearalenon (ZEA), deoxinivalenol (DON) és fumonizin B₁ (FB₁) hatása kevert tenyészetek életképességére. A primer kevert tenyészeteket DIV7-8 napokon 1 nM-50 µM koncentráció tartományban kezeltem a mikotoxinokkal. Az egyes toxinok hatását 24 (**A**), illetve 48 órás (**B**) kezelést követően mértem meg. Az eredményeket a kontroll, oldószerrel kezelt értékek százalékában, átlag ± SEM értékben adtam meg. (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$). Az adatsor toxinonként minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származik ($n > 12$).

Eredményeim az mutatják, hogy a vizsgált toxinok különböző módon hatnak a sejtek életképességére (6. ábra), és hatásuk a kezelés időtartamának növelésével egyes esetekben potencírozható (6.B ábra).

A DON 2 µM-nál kisebb koncentrációkban alkalmazva a kontroll tenyészetek eredményeihez képest jelentős változást nem okozott. 2-50 µM közötti tartományban viszont a kezelés időtartamától függetlenül, koncentráció függő módon csökkentette a

sejtek életképességét. Ez utóbbi hatást, az 50 μ M-os koncentráció esetén, a hosszabb idejű (48 órás) kezelés tovább növelte (6.,7.A ábra).



7. ábra. A zearalenon (ZEA), a deoxinivalenol (DON) és a fumonizin B₁ (FB₁) hatása kevert tenyészetek életképességére. **(A)** DON; **(B)** FB₁; **(C)** ZEA hatása 24 és 48 óra inkubálási idő után. Az eredményeket átlag \pm SEM értékben adtam meg a kontroll értékek százalékában. A „\$” a 24 és 48 órás adatok közötti szignifikanciát jelöli (\$: $p < 0,05$). Az adatok minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származnak.

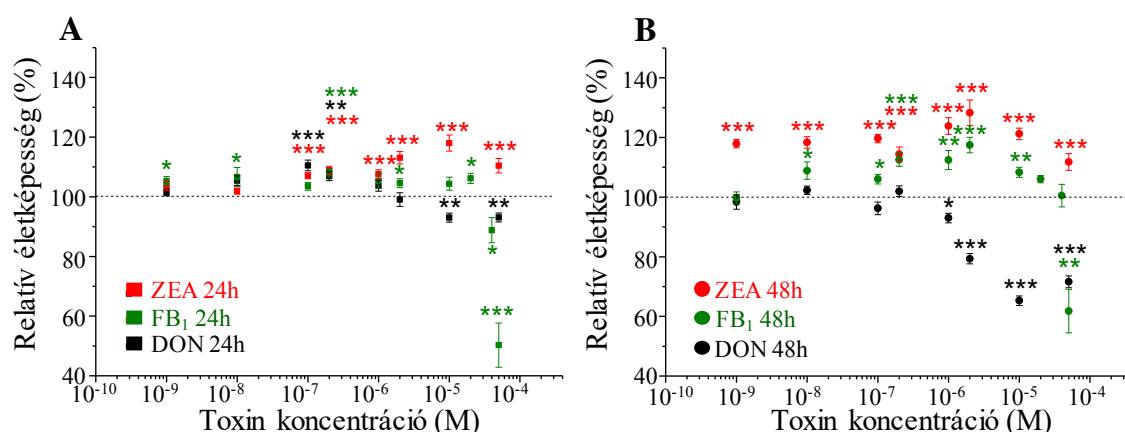
A fumonizin B₁ (FB₁) már 1 nM koncentrációban is szignifikánsan növelte a sejtek életképességét (6.A,B ábra), viszont 10 μ M koncentráció felett alkalmazva ez a hatás csökkent, 50 μ M toxinkoncentráció mellett pedig már nem tapasztaltam szignifikáns különbséget a kontroll adatokhoz viszonyítva. A kezelési idő növelése a toxin hatását nem befolyásolta (7.B ábra).

Zearalenonnal kezelve a sejteket, szignifikáns életképesség növekedést tapasztaltam a teljes, 1 nM-50 μ M közötti koncentráció tartományban (6. ábra), melyet a kezelési idő növelése tovább erősített (7.C ábra). 24 óra után a kontroll értékekhez képest 20-30%-os, 48 órás inkubálási idő után 40-60%-os életképesség növekedést detektáltam (7.C ábra).

5.2. Mikotoxinok hatása tiszta neuron tenyészet életképességére

Az MTT mérések adatai mindig egy adott tenyészet összes sejtjének életképességét jellemzik, függetlenül attól, hogy az adott tenyészetben milyen sejt típusok, milyen arányban járulnak hozzá a mért jelhez. Annak eldöntésére, hogy a kevert idegi tenyészetekben az egyes toxinok milyen mértékben befolyásolják az ideg- és a glia sejtek működését, glia sejt mentes neuron (tiszta neuron) és idegsejtmentes glia (kevert glia) tenyészeteket hoztam létre.

A tiszta neuron tenyészeteket - az előzőekhez hasonlóan - kiültetést követő 7. vagy 8. napon (DIV7-8) kezeltem a toxinokkal. A sejt kultúrák életképességét 24, illetve 48 órás folyamatos kezelést követően határoztam meg. Bár a toxinok hatása ez esetben is egymástól különböző volt, de azok nem minden esetben követték a kevert tenyészetekben megfigyelteteket.

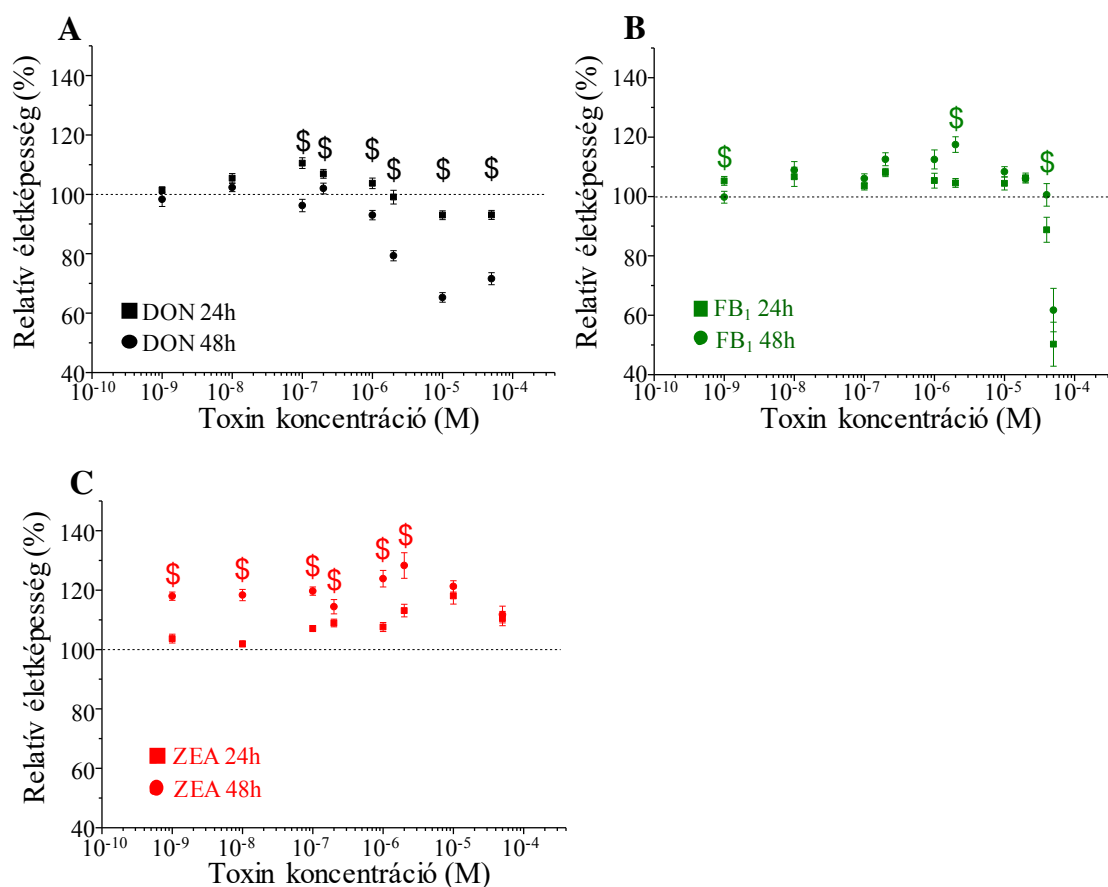


8. ábra. A zearalenon (ZEA), a deoxinivalenol (DON) és a fumonizin B₁ (FB₁) hatása tiszta neuron tenyészetek életképességére. A primer neuron tenyészeteket DIV7-8 napokon kezeltem 1 nM és 50 μ M közötti koncentráció tartományban, majd 24 vagy 48 óra után MTT mérést végeztem. (A) az egyes toxinok hatása 24 óra után; (B) 48 óra után. Az eredményeket átlag \pm SEM értékben adtam meg a kontroll értékek százalékában. (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$). Az adatsor toxinonként minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származik.

A DON-kezelés 1 μ M-nál kisebb dózisban nem befolyásolta a sejtek életképességét. 24 óra után is csak 10 μ M felett csökkentette kis mértékben a viabilitást. 48 órás expozíció után azonban 2 μ M alkalmazott koncentráció felett szignifikáns életképesség csökkenést tapasztaltam (8., 9.A ábra). Így a 24 órás kezeléshez képest a 48 órás expozíció szignifikánsan növelte a vegyület hatását (9.A ábra).

A fumonizin B₁ jelenléte 200 nM és 2 μ M között szignifikáns életképesség növekedést, majd ennél nagyobb dózisban alkalmazva koncentrációfüggő csökkenést indukált. 50 μ M koncentráció mellett drasztikus, 50%-os életképesség csökkenést

eredményezett. Az FB₁ esetén nem találtam különbséget a 24 és a 48 órás adatok között (9.B ábra).

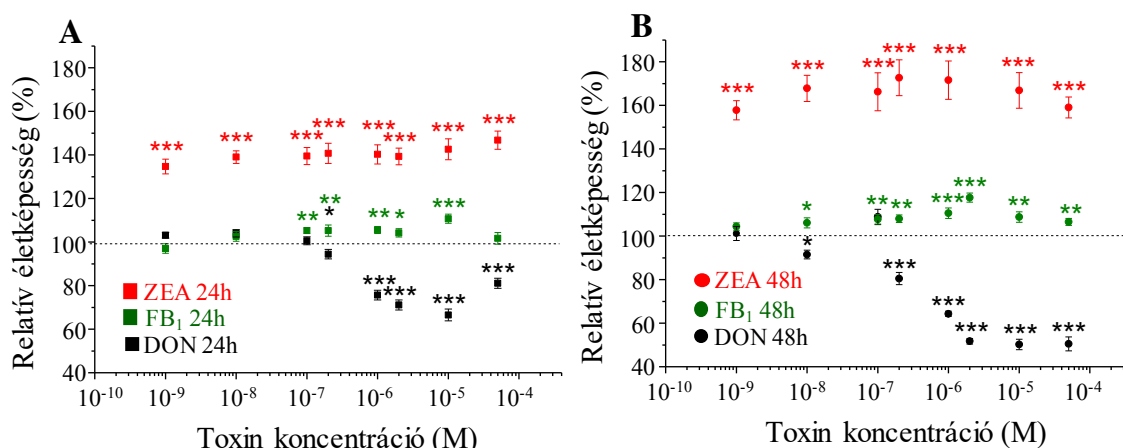


9. ábra. Zearalenon (ZEA), deoxinivalenol (DON) és fumonizin B₁ (FB₁) hatása tiszta neuron tenyészetek életképességére (A) DON; (B) FB₁; (C) ZEA hatása 24 és 48 óra inkubálási idő után. Az eredményeket átlag ± SEM értékben adtam meg a kontroll értékek százalékában. A „\$” a 24 és 48 órás adatok közötti szignifikanciát jelöli (\$: p<0,05). Az adatok minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származnak.

A ZEA-kezelés a teljes vizsgált koncentráció tartományban szignifikáns életképesség növekedést generált (8., 9.C ábra). Ez a növekedés azonban mindenütt 40% alatt maradt, és 50 μ M koncentráció mellett a hatás is csökkent. 10 μ M alatti alkalmazott koncentrációkban a kezelési idő növelése ez esetben is fokozta a ZEA hatását (9.C ábra).

5.3. Mikotoxinok hatása kevert glia tenyészet életképességére

A mikotoxinok hatását újszülött egerek előagyából izolált primer glia tenyészeteken is megvizsgáltam. Az így készített tenyészetek asztroglia sejtek mellett mikroglia sejteket is tartalmazhatnak (kevert glia tenyészet), de eddigi megfigyeléseink alapján főként asztrocita sejtekben gazdagok (nincs bemutatva). A toxin kezelést és az életképesség mérést a korábbi vizsgálataimnak megfelelően végeztem.

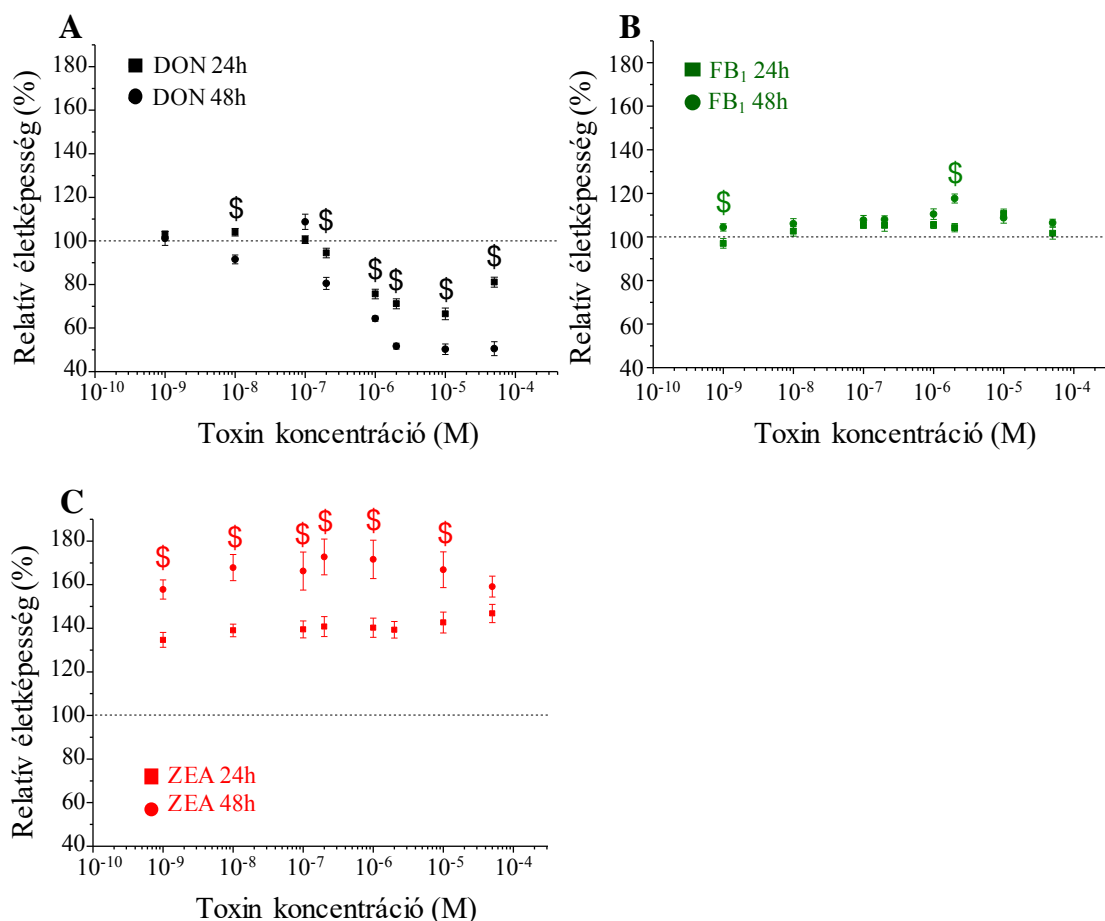


10. ábra. Zearalenon (ZEA), deoxinivalenol (DON) és fumonizin B₁ (FB₁) hatása kevert glia tenyészetek életképességére. A gliális tenyészeteket az átültetésüket követő napon 1 nM-50 μ M koncentráció tartományban kezeltem a mikotoxinokkal. Az egyes toxinok hatását 24 (A), illetve 48 órást (B) követően mértem meg. Az eredményeket a kontroll, oldószerrel kezelt értékek százalékában, átlag \pm SEM értékben adtam meg. (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$). Az adatsor toxinonként minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származik ($n > 12$).

A DON-kezelés a 200 nM feletti koncentrációkban szignifikáns, koncentrációfüggő életképesség csökkenést okozott (10, 11.A ábra). Ez a hatás a kezelési idő növelésével potencírozható volt (2 μ M koncentráció felett a 48 órás kezelés ~65%-kal fokozta az életképesség csökkenést) (11.A ábra).

Az FB₁-kezelés 100 nM és 50 μ M közötti koncentrációkban szignifikáns, de kis mértékű (<17%) életképesség növekedést eredményezett (10., 11.B ábra). Ez a változás - az eddigiekhez hasonlóan - a kezelés időtartamától függetlennek adódott (11.B ábra).

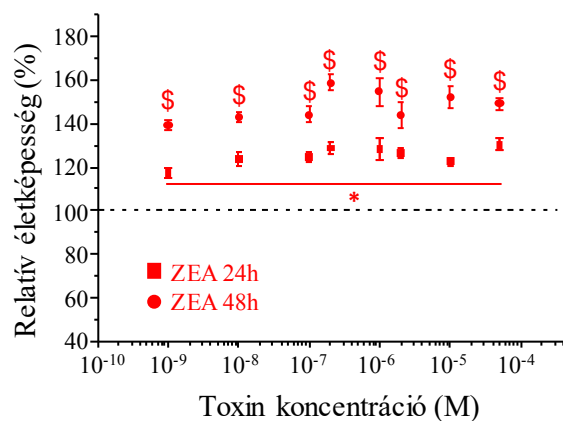
A ZEA jelenléte a kevert glia tenyészetek életképességében meglepő növekedést okozott (10., 11.C ábra). Ez a változás a teljes koncentráció tartományban hasonló módon érvényesült, és a toxin további expozíciójával ~70%-kal növelhető volt (11. C ábra).



11. ábra Zearalenon (ZEA), deoxinivalenol (DON) és fumonizin B₁ (FB₁) hatása kevert gliális tenyészetek életképességére (A) DON; (B) FB₁; (C) ZEA hatása 24 és 48 óra inkubálási idő után. Az eredményeket átlag ± SEM értékben adtam meg a kontroll értékek százalékában. A „\$” a 24 és 48 órás adatok közötti szignifikanciát jelöli (\$: p<0,05). Az adatok minimum három független kísérletről, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származnak.

A zearalenon glia sejt tenyészeteken tapasztalt drasztikus életképesség növelő hatását látva felmerült, hogy a jelenség hátterében a glia sejtek osztódóképességének, proliferációjának növekedése áll. Alternatív hipotézist a sejtek redoxállapotában bekövetkező változások jelenthetnek. Ennek eldöntésére a 96-os lemezekre történő kiültetést követően, a megfelelő denzitás elérése után, a sejtek osztódását CAR kezeléssel⁶ meggátoltam. Két nappal később a tenyészeteket zearalenonnal, a kontrollként szolgáló lyukakat annak oldószerével kezeltem. Eredményeim azt mutatják, hogy a kísérletet így módon elvégezve is visszakapjuk a zearalaneon drasztikus életképesség növelő hatását (12. ábra). A kapott életképesség növekedés a korábban megfigyeltekhez hasonló mértékű, és a kezelési idővel fokozható volt.

⁶ A citozin-arabino-furanozid (CAR) egy fals, nem metabolizálódó nukleotid, mely meggátolja az osztódóképes sejtek DNS szintézisét, így leállítja a sejtosztódást (Cytarabine leírás).



12. ábra Zearalenon hatása CAR kezelt, kevert glia tenyészetek életképességére. A tenyészeteken a 96-lyukú lemezekre való kiültetés után CAR kezelést végeztem. A toxin-kezelést 1 nM és 50 μ M közötti koncentráció tartományban 24, ill. 48 óráig alkalmaztam. Az eredményeket átlag \pm SEM értékben adtam meg a kontroll, nem kezelt értékek százalékában. (*: $p < 0,05$, a kontroll értékekhez viszonyítva). A „\$” jelölés a 24 és 48 óras adatok közötti szignifikanciát jelenti (\$: $p < 0,05$). Az adatsor minimum három független kísérletből, kezelésenként 4-8 párhuzamos mérésből származik.

5.4. Az eredmények összefoglalása

| | <i>Deoxynivalenol (DON)</i> | | <i>Fumonisin B₁ (FB₁)</i> | | <i>Zearalenon (ZEA)</i> | |
|------------------|--|---|--|--------------------------------------|--|--|
| | <i>Koncentrációfüggő hatás</i> | <i>Időbeli kitettség</i> | <i>Koncentrációfüggő hatás</i> | <i>Időbeli kitettség</i> | <i>Koncentrációfüggő hatás</i> | <i>Időbeli kitettség</i> |
| Tenyészet | | | | | | |
| Kevert | Koncentráció függően csökkentette a sejtek életképességét a 2-50 µM közötti tartományban. | 50 µM koncentrációban 48 óra után a hatás kifejezettebb. | 1 nM-10 µM koncentrációban szignifikánsan növelte a sejtek életképességét, elegendő hatása csökkent, 50 µM koncentrációban nem volt hatásos. | Nem tapasztalható szignifikáns hatás | Szignifikáns életképesség növekedés a vizsgált 1 nM és 50 µM közötti teljes koncentráció tartományban | Szignifikáns életképesség növekedés 48 óra után. |
| Neuron | 2-50 µM közötti tartományban szignifikáns, koncentrációfüggő életképesség csökkenés csupán a 48 órás kezeléseket követően. | Szignifikáns különbség a 24 és 48 órás eredmények között. 48 órás kezelésnél kifejezettebb hatás. | 200 nM és 2 µM között szignifikáns életképesség növekedés, majd ennél nagyobb dózisban alkalmazva koncentrációfüggő csökkenés. | Nem tapasztalható szignifikáns hatás | A teljes vizsgált koncentráció tartományban szignifikáns életképesség növekedés. A növekedés sehol nem éri el a 140%-ot. | Szignifikáns életképesség növekedés 48 óra után. |
| Glia | Szignifikáns koncentrációfüggő életképesség csökkenés 200 nM feletti koncentrációkban. | Szignifikáns különbség a 24 és 48 órás eredmények között. 48 órás kezelésnél kifejezettebb hatás. | 100 nM és 50 µM közötti koncentrációkban szignifikáns életképesség növekedés. | Nem tapasztalható szignifikáns hatás | Jelentős életképesség növekedés a teljes koncentráció tartományban. Az életképesség növekedés elérte a 170%-ot. | Szignifikáns életképesség növekedés 48 óra után. |

zöld: növekedés, piros: csökkenés

6. Diszkusszió

A mezőgazdaságban évezredek óta problémát jelent az élelmiszerre és állati takarmányra szánt haszonnövények penészgomba fertőződése. A fonalas gombákban az intenzív növekedési fázist követően, különböző korlátozó tényezők hatására olyan másodlagos anyagcsere utak aktiválódnak, melyek termékei nem szükségesek a növekedéséhez és a szaporodásához, ugyanakkor egyes másodlagos metabolitok, az ún. mikotoxinok humán- és állategészségügyi szempontból potenciális veszélyt hordoznak. A *Fusarium* gombafajok a szántóföldeken kukoricát, búzát, árpát, zabot és további gabonákat fertőznek világszerte. Általuk kiválasztott, toxikológiai szempontból jelentős másodlagos anyagcseretermékek többek között a fumonizinek, trichotecének (pl. a deoxinivalenol) és a zearalenon. Nagyfokú hőstabilitásuk miatt a hőkezelés sem degradálja őket, így képesek bejutni élelmiszerláncon át az emberi, a takarmányokkal az állati szervezetbe. Bár a *Fusarium* mikotoxinok szisztémás hatásairól egyre többet tudunk, célzottan az idegrendszerre gyakorolt hatásairól viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk (Marin és mtsai., 2013). Az idegrendszer sejtjeire kifejtett hatásuk feltárását a vér-agy gát jelenléte, a toxinokból kialakuló különböző metabolitok, valamint az idegszövet komplexitása mind-mind tovább nehezíti. Ezért a kérdés vizsgálatához jó megoldást kínálnak az olyan *in vitro* sejtes modellrendszerek, ahol a főbb idegszöveti sejttypusokon – ideg- és asztroglia sejteken – közvetlenül, célzott méréseket végezhetünk.

Munkám során *in vitro* körülmények között a zearalenon, fumonizin B₁ és a deoxinivalenol mikotoxinok rövid távú, közvetlen, az idegszövet tenyészetek életképességére kifejtett hatásának felderítésére törekedtem. Annak vizsgálatára, hogy a toxinok a központi idegrendszer főbb sejttypusaira rendelkeznek-e szelektív hatással, méréseimet döntően asztroglia sejteket tartalmazó tenyészetben, tiszta agykérgi idegsejt tenyészetben és ezek együttesét tartalmazó tenyészeteken is elvégeztem.

6.1 A fumonizin B₁ mikotoxin a kortikális eredetű sejt kultúrák életképességét jelentősen nem befolyásolja

A fumonizin mikotoxinok közül toxikológiai szempontból a fumonizin B₁ a legfontosabb (Domijan, 2012). Állatokban fajtól függően különböző súlyosságú elváltozásokat okoz, például lovakban agylágyulást (ELEM⁷), sertésekben tüdőödémát

⁷ló leukoencephalomalacia (equine leukoencephalomalacia)

idéz elő (Fazekas, 1999). Mivel szerkezetileg a szfinganinhoz, a szfingolipidek prekursorához hasonlít, befolyásolja a sejtek membránfunkcióit. Egyrészt kompetitíven gátolja a ceramid szintáz szfinganin-ceramid átalakulást katalizáló aktivitását. Másrészt gátolja a mitokondriális transzportlánc I. komplexét, így a sejtlégzést, és csökkenti a mitokondriális membránpotenciált, ami az oxidatív szabadgyökök túltermelését eredményezi. A mitokondriális Ca^{2+} felvétel csökkenésével pedig, a citoplazma Ca^{2+} szintje nő, mindezek együtt sejthalált eredményezhetnek (Domijan, 2012).

Vizsgálatomban a fumonizin B₁ hatását összehasonlítottam primer ideg- és asztroglia sejtek, valamint ezek együttesét tartalmazó tenyészeteken. Eredményeim szerint a toxin - hasonló koncentráció tartományban (1 nM - 10 μM vs. 200 nM - 2 μM) - kismértékű (<20%), de szignifikáns életképesség növekedést eredményezett mind az idegsejteket tartalmazó kortikális kevert mind a tiszta neuron tenyészetekben. A tiszta idegsejt tenyészeteken azonban jelenléte 50 μM koncentráció mellett drasztikusan csökkentette a tenyészetek életképességét. Hatásai a kezelés időtartamától (24 vs. 48 óra) függetlennek bizonyultak. Eredményeim összhangban állnak Harel és munkatársai vizsgálataival, akik primer patkány hippocampális neuron tenyészetekben az FB₁ axonális növekedést gátló hatásáról úgy számoltak be, hogy kísérleteikben a toxin 10-40 μM koncentrációkban 48 óra expozíció után sem bizonyult toxikusnak (Harel és mtsai., 1993).

Az idegsejt tenyészetek mellett az FB₁ az asztrocita sejt kultúrák életképességét is kismértékben és szignifikánsan megemelte. Ez a hatás a teljes vizsgált koncentráció tartományban (1 nM – 50 μM) megfigyelhető volt. Korábbi, glia sejt kultúrákon elvégzett vizsgálatok is hasonló eredményre jutottak. Kwon és munkatársai primer patkány asztro- és oligodendroglia tenyészeteken végzett DNS és fehérje tartalom vizsgálata szerint az FB₁ (0,5-75 μM) 5 vagy 10 nap expozíciós idő után sem bizonyult citotoxikusnak (Kwon és mtsai., 2000). Hasonló eredmények születtek differenciáltatott primer patkány asztrocita sejtek vizsgálata esetén is (Galvano és mtsai., 2002). Bár találtam olyan vizsgálatot is, melyben a toxin primer egér asztrocita sejtenyészetekben, 50 μM koncentrációban, 8 nap inkubációs idő után sejthalált okozott (Osuchowski és mtsai., 2005). Érdeemes megemlíteni, hogy az FB₁ humán SH-SY5Y neuroblasztoma sejteken 200 μM koncentrációban, 24 óra után sem bizonyult toxikusnak (Domijan és mtsai., 2011). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a fumonizin B₁ kevésbé citotoxikus az idegszövet sejtjeire, és károsító hatása függ az alkalmazott koncentrációtól,

expozíciós időtől, sejtípustól, a vizsgált fajtól és a sejt kultúra előállítására használt agyterülettől (Domijan, 2012).

6.2 A deoxinivalenol a kortikális sejt kultúrák életképességét csökkenti

A trichotecének családjába tartozó deoxinivalenolról ismert, hogy gátolja az eukarióta fehérjeszintézist, mivel kötődik a riboszómák 60S alegységéhez, valamint gátló hatást fejt ki a peptidil transzferáz enzim aktivitására is (Doohan és mtsai., 2013). A toxin képes közvetlen idegrendszeri hatást kifejteni, mivel a vérben keringő DON egy része képes átjutni a vér-agy gáton (Maresca, 2013). Elsősorban emezist⁸ és anorexiát indukál sertésekben és egerekben, de *in vivo* leírták idegi gyulladást kiváltó hatását is (Girardet és mtsai., 2011a és 2011b). Sejtszintű idegrendszeri hatásairól csak szórványos adatok állnak rendelkezésre.

Eredményeim alapján a toxin mindhárom tenyészet típusban, koncentráció és expozíciós időtől függő módon⁹ csökkentette a sejtek életképességét. Hatására legérzékenyebbnek a glia tenyészetek bizonyultak, ahol - szemben a tiszta neuron és kevert tenyészetekkel - már 24 órás kezelési idő után 1 μM koncentráció felett jelentős, koncentráció függő életképesség csökkenés alakult ki. Hasonló jelenségről számolnak be Razafimanjato és munkatársai is, akik *in vitro* patkány glia sejt tenyészeteken a deoxinivalenolt 0,1-100 μM tartományban találták citotoxikusnak. Bár a toxin az asztroglia sejtek életképességét is csökkentette, főként a mikroglia sejtek voltak érzékenyek rá. A kutatók humán asztroglia sejtvonalon (STTG-1) is hasonló hatásokat mértek. Ezen túlmenően kimutatták, hogy a toxin gátolta az asztrociták glutamát felvételét is, mely a normál idegrendszeri működés során alapvető funkciója ezen sejteknek (Razafimanjato és mtsai., 2011).

A DON idegsejtek életképességét csökkentő hatása, legjobb tudomásom szerint, új, eddig nem publikált tudományos eredmény. Mivel MTT mérések során a formazán képződése a sejt redukáló kapacitásának (NADH dehidrogenáz aktivitásának) a függvénye, és homogén sejtpopulációk esetén a formazán mennyiség arányos az élő sejtek számával, ezért további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a megfigyelt életképességi változások mögött sejtpusztulás (citotoxicitás) vagy a sejtek redox kapacitásának változása (metabolikus hatás) áll.

⁸ hányás

⁹ kevert tenyészetekben csak 50 μM -os koncentrációban.

6.3 A zearalenon az idegi sejt kultúrák életképességét nem proliferatív úton, jelentősen növeli

A zearalenon (és metabolitjai az α -zearalenol és β -zearalenol), ugyan gyengébben, mint a női nemi ösztrogén, a 17β ösztradiol, de képes az állati szervezetekben az ösztrogén receptorok mindkét formájához ($ER\alpha$, $ER\beta$) kötődni¹⁰ (Nikov és mtsai. 2000). A fuzáriózis ezért a ZEA-n keresztül zavart okozhat a nemi és reprodukív működésben (Kriszt és mtsai., 2015). A felnőtt agy normál neurális működésének fenntartásában is fontos szerepe van az ösztrogéneknek. Védelmet nyújtanak a károsodásokkal szemben, serkentik az axon növekedést, szinaptikus transzmissziót és a neurogenézist (Wise és mtsai., 2001). Így a táplálékkal felvett mikoösztrogének igen szerteágazó idegi hatásokat válthatnak ki. Például a zearalenon egyik metabolitjáról az α -zearalenolról kimutatták, hogy patkány hippokampális neuron tenyészetekben megvédi az idegsejteket az amiloid- β -fehérje által okozott oxidatív károsodástól¹¹ (Dong és mtsai., 2007).

In vitro vizsgálatomban a ZEA mindhárom tenyészet típusban expozíciós időtől függő módon (48h > 24 h) növelte a sejtek életképességét. Hatása már a legkisebb alkalmazott koncentráció (1 nM) esetén is kifejezett volt, és leginkább a glia sejteket tartalmazó tenyészetekben érvényesült. (A zearalenon a tiszta neuron tenyészetekben is a teljes vizsgált koncentráció tartományban szignifikáns életképesség növekedést generált, de kisebb mértékben, mint a kevert tenyészetek és a gliális kultúrák esetén.)

A tapasztalt életképesség növekedés hátterében, a DON hatásánál megvitatottakkal megegyezően, itt is sejtszám és/vagy anyagcsere változások állhatnak. Bár Withanage és munkatársai kimutatták, hogy a ZEA növelte humán rákos sejtvonalak (SKN, HHUA) proliferációját (Withanage és mtsai., 2001), vizsgálataimat sejtosztódásban gátolt asztroglia tenyészeteken elvégezve hasonló hatást detektáltam, mint azon sejt kultúrákban, ahol a gliasejtek osztódhattak. Így esetemben a kapott eredmények mögött a ZEA sejtproliferációt serkentő hatása kizárható. A toxin pontos hatásmechanizmusának felderítésére további vizsgálatok szükségesek.

A kapott adatok értelmezésénél fontos szempont, hogy az általam elvégzett vizsgálatok *in vitro* körülmények között zajlottak. A sejttösszetétel, a sejtek kölcsönhatásai, szisztémás homeosztatikus mechanizmusok nem egyeznek az *in vivo*

¹⁰ A receptorokhoz való kötődés eltérő erősségű, a ZEA az $ER\beta$ receptorokhoz háromszor erősebben köt, mint az $ER\alpha$ -hoz (Nikov és mtsai. 2000).

¹¹ Az agyban az amiloid- β -fehérje akkumulációja jellemző Alzheimer-kórban, mely károsítja az agyszövetet.

körülményekkel. Ugyanakkor eredményeim hozzájárulhatnak a *Fusarium* mikotoxinok idegrendszeri hatásainak felderítését és a tolerálható humán- és állategészségügyi értékek pontosabb meghatározását célzó törekvésekhez.

7. Szerzői hozzájárulás

- A dolgozatban szereplő adatok forrásául szolgáló primer kortikális idegsejtenyészetek előállításában és fenntartásában aktívan részt vettem.
- A sejtenyészetek toxinkezelésében és a mikotoxinok hatását vizsgáló MTT életképesség mérésekben, illetve azok kiértékelésében aktívan részt vettem.
- A dolgozatban bemutatott grafikonok saját munkáim.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton fejezem ki köszönetemet témavezetőmnek Tárnok Krisztiánnak a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségével. Hálás vagyok türelméért és támogatásáért. Köszönetemet szeretném kifejezni Schlett Katalinnak, aki az ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék Idegi Sejtbiológia Kutatócsoportjában a kutatómunka lehetőségét biztosította, segített a kísérletek megtervezésében és kivitelezésében. Köszönettel tartozom Tagscherer-Micska Brigittának a kísérleti és statisztikai módszerek megtanításáért, a tenyészetek előállításában, fenntartásában, kezelésében nyújtott segítségével, valamint állandó támogatásáért és türelméért.

Kutatásunkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, Dr. Világi Ildikó irányításával megvalósuló **NVKP_16-1-2016-0016** számú pályázata támogatta.



9. Irodalom- és ábraforrás-jegyzék

Citált folyóiratban megjelent közlemények:

- ARUNACHALAM, C., DOOHAN, M. 2013: Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. - *Toxicology Letters*. 217. pp. 149– 158
- DESAI, K., SULLARDS, M. C., ALLEGOOD, J., WANG, E., SCHMELZ, E. M., HARTL, M., HUMPF, H.-U., LIOTTA, D. C., PENG, Q., MERILL JR., A. H. 2002: Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. - *Biochimica et Biophysica Acta*. 1585. pp. 188– 192.
- DONG, Y.-L., ZUO, P.-P., LI, Q., LIU, F.-H., DAI, S.-L., GE, Q.-S. 2007: Protective effects of phytoestrogen α -zearalanol on beta amyloid₂₅₋₃₅ induced oxidative damage in cultured rat hippocampal neurons. – *Endocr.* 32. pp. 206–211.
- DOMIJAN, A.-M., ABRAMOV A. Y. 2011: Fumonisin B₁ inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis-Implication to mechanism of cell toxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 43. pp. 897– 904.
- DOMIJAN, A.-M., KOVAC, S., ABRAMOV, A. Y. 2012: Impact of fumonisin B₁ on glutamate toxicity and low magnesium-induced seizure activity in neuronal primary culture. – *Neuroscience*. 202. pp. 10–16.
- FAZEKAS, B. 1999 Fumonizin toxinok hazai előfordulása, állat- és humán-egészségügyi vonatkozásai Magyar Tudomány 1999/4
- GALVANO, F., CAMPISI, A., RUSSO, A., GALVANO, G., PALUMBO, M., RENIS, M., BARCELLONA, M. L., PEREZ-POLO, J. R., VANELLA, A. 2002: DNA Damage in Astrocytes Exposed to Fumonisin B₁. - *Neurochemical Research*. 27. pp. 345–351.
- GELDERBLOM, W. C. A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., HORAK, R. M., VLEGGAAR, R., KRIEK, N. P. J. 1988: Fumonisin-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. - *Appl. Environ. Microb.* 54. pp. 1806-1811.
- GIRARDET C., BONNET, M. S., JDIR, R., SADOUD, M., THIRION, S., TARDIVEL, C., ROUX, J., LEBRUN, B., MOUNIEN, L., TROUSLARD, J., JEAN, A., DALLAPORTA, M., TROADEC, J.-D. Central Inflammation and Sickness-Like Behavior Induced by the Food Contaminant Deoxynivalenol: A PGE₂-Independent Mechanism. - *Toxicological Sciences*. 124(1): pp. 179–191
- GIRARDET, C., BONNET, M. S., JDIR, R., SADOUD, M., THIRION, S., TARDIVEL, C., ROUX, J., LEBRUN, B., WANAVERBECQ, N., MOUNIEN, L., TROUSLARD, J., JEAN, A., DALLAPORTA1, M., TROADEC, J.-D. 2011: The Food-Contaminant Deoxynivalenol Modifies Eating by Targeting Anorexigenic Neurocircuitry. - *PLoS ONE*. 6(10): e26134

- HAREL, R., FUTERMAN, A. H. 1993: Inhibition of Sphingolipid Synthesis Affects Axonal Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons. - *J Biol Chem.* 268. pp. 14476-81.
- JÁVOR A. - SZIGETI J. 2011: Termékminősítés és termékhigiénia. pp. 18-21.
- KWON O.-S., SLIKKER JR., W., DAVIES D. L. 2000: Biochemical and morphological effects of fumonisin B₁ on primary cultures of rat cerebrum. - *Neurotoxicol Teratol.* 22. PP. 565-72.
- LESUISSE, C., MARTIN, L. J. 2001: Long-Term Culture of Mouse Cortical Neurons as a Model for Neuronal Development, Aging, and Death - *J Neurobiol* 51: pp. 9–23
- LILIOM, H, TÁRNOK, K, ÁBRAHÁM, Z, RÁCZ, B, HAUSSER, A, SCHLETT, K. 2017: Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress via nuclear factor kappa B-independent signaling pathways – *J Neurochem.* 142(6). pp 948-61.
- MARASAS, W. F. O., RILEY, R. T., HENDRICKS, K. A., STEVENS, V. L., SADLER T. W., WAES, J. G.-V., MISSMER, S. A., CABRERA, J., TORRES, O., GELDERBLUM, W. C. A., ALLEGOOD, J. MARTINEZ, C., MADDOX, J., MILLER, J. D., STARR, L., SULLARDS, M. C., ROMAN, A.V., VOSS, K. A., WANG, E., MERILL, JR, A. H. 2004: Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. - *J. Nutr.* 134. pp. 711–716.
- MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V., 2013: Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. - *Food and Chemical Toxicology.* 60. pp. 218–237.
- MARESCA, M., 2013: From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol -*Toxins* 5. pp. 784-820.
- MOSMANN, T. 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. - *J Immunol Methods* 65. pp. 55-63.
- NIKOV, G.N., HOPKINS, N.E., BOUE, S., ALWORTH, W.L. 2000: Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. - *Environ. Health Perspect.* 108. pp. 867– 872.
- OSUCHOWSKI, M.F., SHARMA, R.P. 2005: Fumonisin B₁ induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2

cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. - *Neurotoxicology*. 26. pp. 981-92.

PINTON, P., NOUGAYRÈDE, J.-P., DEL RIO, J.-C., MORENO, C., MARIN, D. E., FERRIER, L., BRACARENSE, A.-P., KOLF-CLAUW, M., OSWALD, I. P., 2009: The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. - *Toxicology and Applied Pharmacology* 237. pp. 41-48

RAZAFIMANJATO, H., BENZARIA, A., TAIEB, N., GUO, X.-J., VIDAL, N., DI SCALA, C., VARINI, K., MARESCA, M. 2011: The Ribotoxin Deoxynivalenol Affects the Viability and Functions of Glial Cells. - *GLIA* 59. pp. 1672–1683.

da ROCHA, M. E. B., FREIRE, F. DA C. O., MAIA, F. E. F., GUEDES, M. I. F., RONDINA, D. 2012: Mycotoxins and their effects on human and animal health. - *Food Control*. 36. pp. 159-165.

KRISZT R., WINKLER ZS., POLYÁK Á., KUTI D., MOLNÁR CS., HRABOVSKY E., KALLÓ I., SZÓKE ZS., FERENCZI SZ., KOVÁCS K. J. 2015: Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling. - *Endocrinology* 156. pp. 3996–4007.

TÁRNOK, K., SZILÁGYI, L., BERKI, T., NÉMETH, P., GRÁF, L., SCHLETT, K. 2010: Anoxia leads to a rapid translocation of human trypsinogen 4 to the plasma membrane of cultured astrocytes. – *J Neurochem* 115(2). pp. 314-24.

TÁRNOK, K., KISS, E., LUITEN, P.G., NYAKAS, C., TIHANYI, K., SCHLETT, K., EISEL, U.L. 2008: Effects of Vinpocetine on mitochondrial function and neuroprotection in primary cortical neurons. - *Neurochem Int.* 53(6-8). pp. 289-95.

WISE, P. M., DUBAL, D.B., WILSON, M. E, RAU, S. W., LIU, Y. 2001: Estrogens: Trophic and Protective Factors in the Adult Brain- *Frontiers in Neuroendocrinology*. 22. pp. 33– 66.

WITHANAGE, G. S, MURATA, H., KOYAMA, T., ISHIWATA, I., 2001: Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. - *Vet Hum Toxicol.* 43(1). pp. 6-10.

Egyéb hivatkozások:

SCOOP felmérés: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:HU:PDF>

SCF vélemény: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out185_en.pdf

KOVÁCS M., HORN P., MAGYAR T., TORNÝOS G., PÓSA R., MÉZES M., CSEH S., SZABÓ A., SZABÓ-FODOR J. 2016: Konferencia melléklet - A fumonizin B1 mikotoxin a táplálékláncban és egészségkárosító hatásai. In memoriam Kovács

Ferenc Nemzetközi Állatorvos És Állattenyésztő Kongresszus – 2016
<http://real.mtak.hu/47619/1/Rabbit.pdf>

Fuzárium NÉBIH tájékoztató:

<http://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/21384/Fuzarium+t%C3%A1j%C3%A9koztat%C3%B3.pdf/f1a6858e-77f3-4bf0-a3a3-f42a5797bad4>

Cytarabine leírás: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cytarabine>

Ábrák forrásjegyzéke:

[1] forrás: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/fusarium-culmorum>

[2] <https://www.agrarunio.hu/index.php/hirek/2647-nyugodtabban-alhat-ha-komplex-hatasugombaoelo-szert-hasznal>

[3] MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V., 2013: Mycotoxins: Occurence, toxicology, and exposure assessment. - *Food and Chemical Toxicology*. 60. pp. 218–237.

[5] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

10. Mellékletek

Adatsor a mikotoxinok kevert tenyészeteken mért hatásáról

| DON 24h kevert | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 93,07 | 99,14 | 94,73 | 102,51 | 90,25 | 89,86 | 77,38 | 79,22 | | |
| n | 72 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | | |
| sd | 12,07 | 14,14 | 13,32 | 13,55 | 11,51 | 19,63 | 14,10 | 11,86 | 11,48 | | |
| sem | 1,4 | 2,4 | 2,2 | 2,3 | 1,9 | 3,3 | 2,3 | 2,0 | 1,9 | | |
| DON 48h kevert | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 103,92 | 97,68 | 108,65 | 103,70 | 96,48 | 84,77 | 76,56 | 66,80 | | |
| n | 60 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | | |
| sd | 13,91 | 12,88 | 23,73 | 12,39 | 17,16 | 13,84 | 23,61 | 14,06 | 12,11 | | |
| sem | 1,8 | 2,4 | 4,3 | 2,3 | 3,1 | 2,5 | 4,3 | 2,6 | 2,2 | | |
| FB ₁ 24h kevert | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 2*10 ⁻⁵ | 4*10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ |
| átlag | 99,36 | 120,81 | 122,24 | 108,80 | 114,41 | 108,70 | 116,44 | 112,23 | 97,25 | 104,47 | 102,82 |
| n | 30 | 12 | 12 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 18 | 18 | 30 |
| sd | 10,44 | 10,48 | 10,00 | 17,68 | 9,41 | 10,01 | 13,45 | 11,82 | 15,77 | 6,33 | 13,00 |
| sem | 1,9 | 3,0 | 2,9 | 3,2 | 1,7 | 1,8 | 2,5 | 2,2 | 3,7 | 1,5 | 2,4 |
| FB ₁ 48h kevert | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 2*10 ⁻⁵ | 4*10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ |
| átlag | 92,99 | 113,49 | 119,61 | 118,78 | 113,56 | 112,06 | 117,32 | 119,49 | 112,55 | 107,02 | 99,42 |
| n | 42 | 24 | 24 | 42 | 30 | 30 | 42 | 42 | 30 | 30 | 42 |
| sd | 10,07 | 11,20 | 12,83 | 13,41 | 8,75 | 10,20 | 12,57 | 12,89 | 16,23 | 16,72 | 23,80 |
| sem | 1,6 | 2,3 | 2,6 | 2,1 | 1,6 | 1,9 | 1,9 | 2,0 | 3,0 | 3,1 | 3,7 |
| ZEA 24h kevert | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 124,68 | 126,13 | 137,25 | 131,74 | 140,36 | 136,00 | 142,80 | 114,04 | | |
| n | 46 | 23 | 22 | 23 | 18 | 23 | 23 | 24 | 23 | | |
| sd | 9,10 | 11,91 | 14,80 | 12,46 | 10,86 | 9,05 | 15,03 | 11,63 | 15,89 | | |
| sem | 1,3 | 2,5 | 3,2 | 2,6 | 2,6 | 1,9 | 3,1 | 2,4 | 3,3 | | |
| ZEA 48h kevert | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 98,28 | 144,69 | 146,10 | 142,55 | 154,92 | 156,80 | 161,76 | 151,11 | 131,36 | | |
| n | 58 | 30 | 29 | 27 | 28 | 26 | 28 | 30 | 25 | | |
| sd | 15,28 | 23,43 | 22,74 | 19,88 | 29,51 | 28,58 | 29,96 | 25,82 | 20,17 | | |
| sem | 2,0 | 4,3 | 4,2 | 3,8 | 5,6 | 5,6 | 5,7 | 4,7 | 4,0 | | |

*(n: darabszám; sd: szórás; sem: standard error of the mean)

Adatsor a mikotoxinok neuron tenyészeteken mért hatásáról

| DON 24h neuron | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 101,41 | 105,42 | 110,51 | 106,90 | 103,70 | 99,07 | 92,98 | 93,07 | | |
| n | 57 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 24 | 30 | 30 | | |
| sd | 6,19 | 6,26 | 8,57 | 9,84 | 8,29 | 10,00 | 11,16 | 8,27 | 7,95 | | |
| sem | 0,8 | 1,1 | 1,6 | 1,8 | 1,5 | 1,8 | 2,3 | 1,5 | 1,5 | | |
| DON 48h neuron | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 98,34 | 102,30 | 96,25 | 101,97 | 93,00 | 79,35 | 65,29 | 71,60 | | |
| n | 35 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | | |
| sd | 10,28 | 10,00 | 5,97 | 8,90 | 7,80 | 6,80 | 7,21 | 6,91 | 8,55 | | |
| sem | 1,7 | 2,4 | 1,4 | 2,1 | 1,8 | 1,6 | 1,7 | 1,6 | 2,0 | | |
| FB ₁ 24h neuron | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 2*10 ⁻⁵ | 4*10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 105,24 | 106,62 | 103,50 | 108,05 | 105,33 | 104,56 | 104,38 | 106,20 | 88,78 | 50,27 |
| n | 60 | 18 | 18 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 12 | 12 | 30 |
| sd | 6,10 | 6,49 | 13,68 | 7,29 | 7,73 | 13,56 | 8,22 | 11,84 | 5,91 | 14,46 | 40,67 |
| sem | 0,8 | 1,5 | 3,2 | 1,3 | 1,4 | 2,5 | 1,5 | 2,2 | 1,7 | 4,2 | 7,4 |
| FB ₁ 48h neuron | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 2*10 ⁻⁵ | 4*10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 99,76 | 108,86 | 106,03 | 112,53 | 112,46 | 117,48 | 108,35 | 106,04 | 100,51 | 61,75 |
| n | 60 | 18 | 16 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 12 | 12 | 30 |
| sd | 11,37 | 8,63 | 11,40 | 8,65 | 12,27 | 17,60 | 14,16 | 9,30 | 4,21 | 13,01 | 40,14 |
| sem | 1,5 | 2,0 | 2,9 | 1,6 | 2,2 | 3,2 | 2,6 | 1,7 | 1,2 | 3,8 | 7,3 |
| ZEA 24h neuron | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 103,67 | 101,89 | 107,08 | 108,93 | 107,56 | 113,11 | 118,00 | 110,41 | | |
| n | 53 | 30 | 29 | 30 | 30 | 29 | 30 | 30 | 29 | | |
| sd | 6,93 | 7,96 | 5,35 | 5,62 | 6,94 | 8,04 | 11,72 | 14,64 | 12,72 | | |
| sem | 1,0 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 2,1 | 2,7 | 2,4 | | |
| ZEA 48h neuron | | | | | | | | | | | |
| alkalmazott végkoncentrációk (M) | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 2*10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 2*10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁵ | 5*10 ⁻⁵ | | |
| átlag | 100,00 | 117,94 | 118,35 | 119,67 | 114,42 | 123,84 | 128,28 | 121,22 | 111,77 | | |
| n | 29 | 12 | 12 | 12 | 12 | 17 | 18 | 18 | 17 | | |
| sd | 4,88 | 4,72 | 6,42 | 4,86 | 8,20 | 11,60 | 18,36 | 8,25 | 11,39 | | |
| sem | 0,9 | 1,4 | 1,9 | 1,4 | 2,4 | 2,8 | 4,3 | 1,9 | 2,8 | | |

*(n: darabszám; sd: szórás; sem: standard error of the mean)

Adatsor a mikotoxinok asztrogliá tenyészeteken mért hatásáról

| <i>DON 24h glia</i> | | | | | | | | | |
|---|----------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 98,91 | 103,13 | 103,99 | 100,58 | 94,46 | 75,64 | 71,14 | 66,51 | 81,07 |
| n | 85 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| sd | 7,96 | 6,67 | 8,48 | 9,13 | 11,17 | 11,11 | 11,80 | 13,69 | 11,61 |
| sem | 0,9 | 1,3 | 1,7 | 1,8 | 2,2 | 2,2 | 2,3 | 2,7 | 2,3 |
| <i>DON 48h glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 101,14 | 91,52 | 108,78 | 80,50 | 64,32 | 51,70 | 50,27 | 50,53 |
| n | 150 | 28 | 27 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| sd | 14,34 | 16,90 | 10,23 | 18,70 | 15,06 | 6,54 | 6,93 | 12,44 | 17,00 |
| sem | 1,2 | 3,2 | 2,0 | 3,5 | 2,8 | 1,2 | 1,3 | 2,4 | 3,2 |
| <i>FB₁ 24h glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 97,04 | 102,60 | 105,26 | 105,24 | 105,54 | 104,22 | 110,70 | 101,70 |
| n | 112 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| sd | 7,49 | 10,41 | 10,50 | 6,10 | 12,11 | 7,39 | 8,81 | 9,90 | 12,59 |
| sem | 0,7 | 2,2 | 2,2 | 1,3 | 2,6 | 1,6 | 1,9 | 2,1 | 2,7 |
| <i>FB₁ 48h glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 104,40 | 106,08 | 107,69 | 107,97 | 110,48 | 117,64 | 108,72 | 106,53 |
| n | 108 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 20 | 21 | 21 |
| sd | 10,61 | 7,99 | 10,68 | 9,96 | 7,58 | 10,77 | 9,51 | 10,98 | 7,34 |
| sem | 1,0 | 1,7 | 2,3 | 2,2 | 1,7 | 2,4 | 2,1 | 2,4 | 1,6 |
| <i>ZEA 24h glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,75 | 134,68 | 139,01 | 139,51 | 140,76 | 140,27 | 139,33 | 142,65 | 146,80 |
| n | 88 | 26 | 25 | 26 | 25 | 26 | 25 | 26 | 26 |
| sd | 10,60 | 17,33 | 14,41 | 19,88 | 23,10 | 22,29 | 18,96 | 24,42 | 21,32 |
| sem | 1,1 | 3,4 | 2,9 | 3,9 | 4,6 | 4,4 | 3,8 | 4,8 | 4,2 |
| <i>ZEA 48h glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 157,81 | 167,82 | 166,24 | 172,70 | 171,60 | 137,32 | 166,86 | 159,10 |
| n | 142 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 | 29 | 30 | 29 |
| sd | 27,94 | 23,54 | 31,54 | 46,25 | 43,26 | 46,78 | 24,43 | 44,81 | 25,94 |
| sem | 2,3 | 4,4 | 6,0 | 8,7 | 8,2 | 8,8 | 4,5 | 8,2 | 4,8 |

*(n: darabszám; sd: szórás; sem: standard error of the mean)

Adatsor a mikotoxinok sejtosztódásban gátolt asztrocita sejteken mért hatásáról

| <i>ZEA 24h osztódás gátolt glia</i> | | | | | | | | | |
|---|----------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,000 | 117,104 | 123,731 | 124,647 | 128,711 | 128,433 | 126,502 | 122,474 | 130,279 |
| n | 48 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| sd | 11,29 | 10,34 | 13,88 | 9,93 | 15,68 | 24,86 | 11,74 | 10,32 | 14,14 |
| sem | 1,6 | 2,1 | 2,8 | 2,0 | 3,2 | 5,1 | 2,4 | 2,1 | 2,9 |
| <i>ZEA 48h osztódás gátolt glia</i> | | | | | | | | | |
| <i>alkalmazott végkoncentrációk (M)</i> | | | | | | | | | |
| | 0 | 10⁻⁹ | 10⁻⁸ | 10⁻⁷ | 2*10⁻⁷ | 10⁻⁶ | 2*10⁻⁶ | 10⁻⁵ | 5*10⁻⁵ |
| átlag | 100,00 | 139,14 | 142,92 | 144,12 | 158,65 | 154,36 | 143,84 | 151,96 | 149,16 |
| n | 48 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| sd | 10,06 | 12,91 | 12,22 | 16,78 | 18,84 | 30,72 | 26,86 | 23,02 | 13,26 |
| sem | 1,5 | 2,6 | 2,5 | 3,4 | 3,8 | 6,3 | 5,5 | 4,7 | 2,7 |

*(n: darabszám; sd: szórás; sem: standard error of the mean)